

**SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DE SÃO PAULO  
COORDENADORIA DE SERVIÇOS DE SAÚDE  
INSTITUTO LAURO DE SOUZA LIMA**

**DAYANE CAROLINA DOS SANTOS MASSANARO  
DÉBORA BERSAN PERES**

**CARACTERIZAÇÃO DE MODELO MURINO DE GRANULOMA NÃO INFECCIOSO  
EM COMPARAÇÃO À TÉCNICA DE SHEPARD DE INFECCÃO POR *M. leprae***

**BAURU**

**2021**

**DAYANE CAROLINA DOS SANTOS MASSANARO**

**DÉBORA BERSAN PERES**

**CARACTERIZAÇÃO DE MODELO MURINO DE GRANULOMA NÃO INFECCIOSO  
EM COMPARAÇÃO À TÉCNICA DE SHEPARD DE INFECCÃO POR *M. leprae***

Trabalho de Conclusão de Curso de Especialização apresentado ao Instituto Lauro de Souza Lima, Unidade do Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP - “Dr. Antônio Guilherme de Souza”, como requisito parcial para obtenção do título de Especialista Multiprofissional em Assistência Dermatológica, área de concentração Análises Clínicas, sob orientação da Profa. Dra. Maria Renata Sales Nogueira, coorientação da Profa. Daniele Ferreira de Faria Bertoluci.

**BAURU**

**2021**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE BIBLIOTECA DO  
INSTITUTO "LAURO DE SOUZA LIMA"

M382c Massanaro, Dayane Carolina dos Santos.

Caracterização de modelo murino de granuloma não infeccioso em comparação à técnica de Shepard de infecção por *M. Leprae* / Dayane Carolina dos Santos Massanaro; Débora Bersan Peres, Bauru, 2021.  
38f.; il.

Monografia apresentada ao programa de Especialização Multiprofissional em Assistência Dermatológica do Centro Formador de Recursos Humanos para o SUS/SP "Dr. Antônio Guilherme de Souza", unidade didática Instituto Lauro de Souza Lima, sob orientação da Dra. Maria Renata Sales Nogueira e coorientação Ms. Daniele Ferreira de Faria Bertoluci.

1. Hanseníase. 2. *Mycobacterium Leprae*. 3. Nitrocelulose. 4. Granuloma. I. Peres, Débora Bersan. II. Nogueira, Maria Renata Sales. III. Bertoluci, Daniele Ferreira de Faria. IV. Título.

WC335.403

DAYANE CAROLINA DOS SANTOS MASSANARO

DÉBORA BERSAN PERES

**CARACTERIZAÇÃO DE MODELO MURINO DE GRANULOMA NÃO INFECCIOSO  
EM COMPARAÇÃO À TÉCNICA DE SHEPARD DE INFECÇÃO POR *M. leprae***

Trabalho de Conclusão de Curso de Especialização apresentado ao Instituto Lauro de Souza Lima, Unidade do Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP - "Dr. Antônio Guilherme de Souza", como requisito parcial para obtenção do título de Especialista Multiprofissional em Assistência Dermatológica, área de concentração Análises Clínicas, sob orientação da Profa. Dra. Maria Renata Sales Nogueira, coorientação da Profa. Daniele Ferreira de Faria Bertoluci



**Maria Renata Sales Nogueira**

Orientadora



**Daniele Ferreira de Faria Bertoluci**

Coorientadora

Bauru, 26/02/2021

## **AGRADECIMENTOS**

Agradecemos primeiro a Deus que nos sustentou, guardou e nos deu essa oportunidade.

À nossa família, pelo amor e apoio.

À nossa querida orientadora Profa. Dra. Maria Renata Sales Nogueira por todo apoio, dedicação, paciência e incentivo em todos os momentos, à nossa coorientadora Profa. Daniele Ferreira de Faria Bertoluci e colaboradora Profa. Dra. Adriana Sierra Assencio Almeida Barbosa que foram imprescindíveis para esse trabalho, sempre nos auxiliando.

À seção de biblioteca que nos orientou com excelência no atendimento, e ajudou com as normas do trabalho.

À equipe de patologia e demais profissionais que nos auxiliaram nas técnicas para obtenção dos resultados.

Aos profissionais do biotério pelo cuidado e tratamento com os animais no decorrer do trabalho.

À coordenação do curso e à equipe da seção de ensino e treinamento por todo o apoio, acolhimento, determinação e dedicação, para que mesmo com a pandemia pudéssemos usufruir dessa especialização que nos trouxe muito aprendizado.

Aos nossos colegas do curso de especialização por esse período de experiência, amizade e união.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização dessa pesquisa.

## RESUMO

Na hanseníase, o modelo de Shepard de inoculação por *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*) em patas de camundongos vem sendo utilizado em diversos estudos sobre a resposta imune, avaliação de novas drogas e esquemas terapêuticos, além da dinâmica da infecção precoce e crônica. Para estudar o papel do microambiente granulomatoso na hanseníase, além de modelos animais convencionais ou imunocomprometidos, o desenvolvimento de modelos murinos de granuloma não infeccioso pode adicionar parâmetros patogênicos a serem comparados no desenvolvimento da doença. Preparações de nitrocelulose estão entre as formas de desenvolvimento de granulomas não imunogênicos em experimentação animal. O presente estudo investigou a formação de granulomas não infecciosos induzidos por partículas de nitrocelulose, em comparação a lesões induzidas por *M. leprae*. Grupos de camundongos *nude* e BALB/c, foram constituídos e inoculados, conforme a técnica de Shepard, com suspensão de *M. leprae* (ML), suspensão de nitrocelulose (NT), associação de *M. leprae* com nitrocelulose (ML/NT) e veículo controle (CTRL). Após 07, 14, 21 e 28 dias, amostras foram coletadas e analisadas histopatologicamente pelas colorações, Hematoxilina-Eosina e Fite-Faraco. Os grupos experimentais demonstraram a formação de granulomas em ambas os fenótipos murinos. Principalmente nos grupos NT e ML/NT, as lesões foram caracterizadas por infiltrado inflamatório mononuclear, predominantemente macrófago, com presença de células epitelioides, eventuais macrófagos vacuolizados e ausência de células gigantes multinucleadas. As lesões induzidas exclusivamente por *M. leprae* pareceram menos exuberantes que àquelas observadas nos demais grupos, indicando que a nitrocelulose intensificou a resposta macrófaga nos espécimes avaliados e sugerindo que esse composto pode ser utilizado não só para o desenvolvimento de granulomas não imunogênicos, mas também na exacerbação da resposta imune em granulomas induzidos por agentes infecciosos, como *M. leprae*.

**Palavras-chave:** Hanseníase; *Mycobacterium leprae*; Nitrocelulose; Granuloma

## **ABSTRACT**

*In leprosy, the Shepard model of inoculation by Mycobacterium leprae (M. leprae) in mouse footpad has been used in several studies on the immune response, evaluation of new drugs and therapeutic schemes, in addition to the dynamics of early and chronic infection. To study the role of the granulomatous microenvironment in leprosy, in addition to conventional or immunocompromised animal models, the development of murine models of non-infectious granuloma can add pathogenic parameters to be compared in the development of the disease. Nitrocellulose preparations are among the ways of developing non-immunogenic granulomas in animal experimentation. The present study investigated the formation of non-infectious granulomas induced by nitrocellulose particles, in comparison to lesions induced by M. leprae. Groups of athymic nude and BALB/c mice were set up and inoculated, according to Shepard technique, with M. leprae suspension (ML), nitrocellulose suspension (NT), M. leprae association with nitrocellulose (ML/NT) and control vehicle (CTRL). After 07, 14, 21 and 28 days, samples were collected and histopathologically analyzed by Hematoxylin-Eosin and Fite-Faraco staining. The experimental groups demonstrated the formation of granulomas in both murine strains. Mainly in the NT and ML/NT groups, the lesions were characterized by mononuclear inflammatory infiltrate, predominantly macrophagic, with the presence of epithelioid cells, eventual vacuolated macrophages and absence of multinucleated giant cells. The lesions induced exclusively by M. leprae seemed less exuberant than those observed in the other groups, indicating that nitrocellulose intensified the macrophage response in the specimens evaluated, and suggesting that this compound can be used not only in the development of non-immunogenic granulomas, but also in exacerbation of the immune response in granulomas induced by infectious agents, such as M. leprae.*

**Keywords:** *Leprosy; Mycobacterium leprae; Nitrocellulose; Granuloma*

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Granuloma experimental em camundongos *nude*.

**Figura 2.** Granuloma experimental em camundongos BALB/c.

**Figura 3.** Detalhe granuloma experimental em camundongos *nude*. 28 dpi.

**Figura 4.** Detalhe granuloma experimental em camundongos BALB/c. 28 dpi.

**Figura 5.** Infiltrado inflamatório após 07 dias de inoculação.

**Figura 6.** Infiltrado inflamatório após 14 dias de inoculação.

**Figura 7.** Infiltrado inflamatório após 21 dias de inoculação.

**Figura 8.** Infiltrado inflamatório após 28 dias de inoculação.

**Figura 9.** Tipo de infiltrado inflamatório em granulomas induzidos por *M. leprae* e/ou nitrocelulose.

**Figura 10.** Morfologia dos macrófagos nos granulomas induzidos por *M. leprae* e/ou nitrocelulose.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C - Graus Celsius

μl - Microlitro

Anx. - Anexos cutâneos

BAAR - Bacilo álcool-ácido resistente

BB - *Borderline*

BL - *Borderline-lepromatous*

BT - *Borderline-tuberculoid*

CGMN - Células gigantes multinucleadas

CTRL - Veículo controle

DMSO - Dimetilsulfóxido

DPI - Dias pós inoculação

FF - Fite-Faraco

HBSS - Hanks' *Balanced Salt Solution*

HE - Hematoxilina-Eosina

IL-10 - Interleucina-10

kg - Kilograma

LL - *Lepromatous*

M - Molar

*M. tuberculosis* - *Mycobacterium tuberculosis*

mg - Miligrama

ML - *M. leprae*, *Mycobacterium leprae*

mL - Mililitro

ML/NT - Associação de *M. leprae* com nitrocelulose

mm<sup>2</sup> - Milímetro quadrado

MN - Mononuclear

MØ epi. - Macrófagos epitelioides

MØ vac. - Macrófagos vacuolizados

Musc. - Musculatura esquelética estriada

NT - Suspensão de nitrocelulose

*P. brasiliensis* - *Paracoccidioides brasiliensis*

pH - Potencial hidrogeniônico

PMN - Polimorfonuclear

TT - *Tuberculoid*

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO                                 | 1  |
| 2 JUSTIFICATIVA                              | 4  |
| 3 OBJETIVOS                                  | 5  |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS                         | 7  |
| 4.1 Modelo Biológico                         | 7  |
| 4.2 Desenho Experimental                     | 7  |
| 4.3 Obtenção de Inóculo                      | 7  |
| 4.4 Preparo da Suspensão de Nitrocelulose    | 8  |
| 4.5 Infecção e Indução de Granulomas         | 8  |
| 4.6 Técnica Histoquímica                     | 8  |
| 4.7 Avaliação Histopatológica e Baciloscopia | 9  |
| 4.8 Análise Estatística                      | 9  |
| 5 RESULTADOS                                 | 10 |
| 6 DISCUSSÃO                                  | 21 |
| 7 CONCLUSÃO                                  | 24 |
| CONFLITO DE INTERESSES                       | 24 |
| REFERÊNCIAS                                  | 25 |

## 1. INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica, causada pelo *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*), um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) que apresenta tropismo pelas células gliais dos nervos periféricos e macrófagos (MØ). Ridley e Jopling classificaram, em 1966, as múltiplas manifestações da hanseníase com base em critérios clínicos, baciloscópicos, imunológicos e histopatológicos<sup>1</sup>. O espectro da doença foi dividido em duas formas polares, tuberculóide (TT, *tuberculoid*) e virchowiana (LL, *lepromatous*), e três formas intermediárias, dimorfa (BB, *borderline*), dimorfa-tuberculóide (BT, *borderline-tuberculoid*) e dimorfa-virchowiana (BL, *borderline-lepromatous*)<sup>2-3</sup>.

A transmissão de *M. leprae* se dá por contato íntimo e prolongado, de um indivíduo não tratado para outro que seja susceptível. A Organização Mundial de Saúde (OMS) classifica operacionalmente os pacientes hanseníacos como paucibacilares, quando apresentam até cinco lesões ou multibacilares, quando apresentam seis ou mais lesões<sup>4</sup>. A partir da classificação operacional, os pacientes recebem dois tipos distintos de esquemas terapêuticos, denominados globalmente como poliquimioterapia (PQT)<sup>4</sup>.

Microscopicamente, a hanseníase tem entre suas características a formação de granulomas envolvendo troncos e ramos nervosos cutâneos. A forma TT expressa um perfil de imunidade mediada por células relativamente eficiente, com comprometimento neural agudo e focal<sup>5</sup>. Em contrapartida, a hanseníase LL cursa com resposta imune humoral deficitária, progredindo de forma insidiosa e disseminada<sup>6</sup>. Nas formas intermediárias não polares (BT, BB, BL) os padrões histopatológicos e de comprometimento neural periférico eventualmente se sobrepõem<sup>7</sup>.

Granulomas são características histopatológicas do processo inflamatório crônico e, portanto, persistem no organismo por muito tempo. A depender de sua etiologia, essas lesões podem regredir sem deixar sinais no tecido ou, ainda, estimular fibrose exacerbada durante o processo de reparo, levando à formação de cicatrizes. Essas lesões têm seu gatilho quando MØ são recrutados ao local de estímulo e fagocitam material antigênico ou inerte<sup>8</sup>. Basicamente existem dois tipos de granulomas: imunogênicos (ou infecciosos) e não

imunogênicos (não infecciosos e de corpo estranho). Quando envolvidos em processos infecciosos, podem apresentar áreas de necrose caseosa, ou supurativa, a partir de eventual recrutamento de neutrófilos. Granulomas não infecciosos, podem ser observados em doenças de etiologia imprecisa, como a sarcoidose, ou estar relacionados ao desenvolvimento de neoplasias <sup>8</sup>.

O principal constituinte dos granulomas é a célula epitelióide, um MØ de citoplasma aumentado, hialino e de limites imprecisos, com núcleo alongado e cromatina frouxa. A célula epitelióide difere dos MØ comuns por serem menos volumosos, com núcleo e citoplasma arredondados. O conjunto de células epitelióides em um granuloma, assim como sua conformação individual, lembra vagamente uma estrutura epitelial. Essa seria a razão desse fenótipo celular receber esse nome. As modificações que geram a transformação dos MØ epitelióides são complexas e dependem de fatores específicos da resposta imune, como apresentação de antígenos por MØ, interações com linfócitos T e liberação de citocinas e outros mediadores químicos <sup>9</sup>.

Sob a influência de mediadores como interferon-gama, MØ podem se fundir em células gigantes multinucleadas (CGMN) <sup>8</sup>. Nos granulomas imunogênicos, as CGMN tendem a ter seus núcleos arranjados em ferradura na periferia da célula e são denominadas células gigantes de Langhans. Nos granulomas não imunogênicos, além do citoplasma hialino e eosinofílico, os núcleos celulares se dispõem aleatoriamente, formando as células gigantes tipo corpo estranho <sup>9</sup>. Os granulomas de corpo estranho se desenvolvem ao redor de materiais exógenos indigeríveis, como fios de sutura ou algodão.

Na hanseníase, granulomas são formados a partir de antígenos de *M. leprae* e a dificuldade de se obter seu cultivo *in vitro*, juntamente com possibilidades limitadas de investigação em espécimes de nervos humanos, justificaram a exploração de modelos animais na hanseníase <sup>10-11</sup>. Desde a caracterização inicial de *M. leprae*, investigadores vêm tentando propagar esse bacilo em uma variedade de espécies animais <sup>12</sup>. O cultivo e propagação de *M. leprae* foi tentado em diferentes modelos animais, sem sucesso em sua maioria, devido principalmente à baixa viabilidade de preparações bacilares a partir de tecidos humanos, além da resistência natural da maioria dos hospedeiros <sup>12</sup>. O tatu de nove bandas (*Dasybus*

*novemcinctus*) é considerado como único reservatório natural para o *M. leprae* e a infecção nesses animais recapitula muitos dos aspectos vistos no hospedeiro humano, incluindo o desenvolvimento de neuropatia <sup>13</sup>. No entanto, a utilização de tatus é limitada pelo fato de serem animais não comumente utilizados em ambientes experimentais, além da carência de reagentes e anticorpos devidamente validados para essa espécie <sup>14</sup>.

A técnica de Shepard <sup>15</sup> de inoculação por *M. leprae*, estabelecida no início dos anos 1960, ainda é utilizada em estudos sobre a resposta imune <sup>16</sup>, avaliação de novas drogas e esquemas terapêuticos para hanseníase <sup>17</sup>, além da dinâmica da infecção precoce e crônica <sup>18</sup>. No modelo de Shepard <sup>15</sup>, diferentes linhagens de camundongos são adotadas, como BALB/c, Swiss White e C57Bl/6. Animais imunocomprometidos também são empregados a fim de mimetizar formas menos ou mais imunologicamente responsivas à infecção por *M. leprae*, como o camundongo atímico *nude* (*nu/nu*) <sup>19</sup> ou camundongos deficientes em óxido nítrico sintase induzível (*NOS<sub>2</sub><sup>-/-</sup>*) e IL-10 (*10NOS<sub>2</sub><sup>-/-</sup>*) <sup>18</sup>.

Camundongos geneticamente modificados, com defeitos imunológicos ou bioquímicos específicos, são particularmente úteis para investigar a formação de granulomas e resistência à infecção, contribuindo para o esclarecimento de áreas limítrofes do espectro da hanseníase<sup>20</sup>. O modelo murino de infecção por *M. leprae* também fornece uma interface conveniente entre busca de antígenos de *M. leprae* e a utilização dos mesmos em ensaios clínicos de diagnóstico precoce da doença, principalmente nas formas pouco bacilíferas <sup>21</sup>.

Para estudar o papel do microambiente granulomatoso na hanseníase, além de modelos animais convencionais ou imunocomprometidos, o desenvolvimento de modelos murinos de granuloma não infeccioso, para fins de estabelecimento de analogias histopatológicas, pode adicionar parâmetros patogênicos a serem comparados no desenvolvimento da doença. Embora granulomas experimentais resultem majoritariamente de agentes infecciosos, como *M. leprae*, *P. brasiliensis*, *Leishmania*, granulomas não infecciosos também podem ser induzidos no coxim plantar de camundongos ou ratos, a fim de se estudar a resposta à diversos materiais, além da ação de diferentes tipos de drogas <sup>22</sup>.

A sutura com fio de seda é utilizada em diversos tipos de cirurgias e a permanência desse material nos tecidos pode causar reação granulomatosa, tanto em humanos quanto em animais <sup>23</sup>. O granuloma em decorrência de fios de sutura, reabsorvíveis <sup>24</sup> ou não <sup>25</sup>, pode se manifestar como lesões edemaciadas e eritematosas, podendo eventualmente romper linhas de incisão cirúrgica <sup>25</sup>. Demais métodos de indução de resposta inflamatória intradérmica ou subcutânea já foram descritas previamente, incluindo compostos como a carragenina, algodão e cristais colesterol <sup>26-27</sup>.

Outra forma de desenvolvimento de granulomas em experimentação animal utiliza a nitrocelulose como fator indutor <sup>28</sup>. Hernandez-Pando et al. (2000) <sup>29</sup> prepararam uma suspensão com membranas de nitrocelulose dissolvidas em DMSO para produzirem granulomas imunogênicos (infecciosos) e não imunogênicos (tipo corpo estranho) em patas de camundongos. Os granulomas imunogênicos foram induzidos, além da nitrocelulose, com produtos de cultivo de *M. tuberculosis*, enquanto que os não imunogênicos foram estimulados apenas com nitrocelulose <sup>29</sup>.

Nos questionamos se, um ensaio similar utilizando suspensão de *M. leprae* para a formação de granulomas imunogênicos a serem comparados com lesões induzidas apenas por nitrocelulose, poderia nos trazer uma ferramenta de comparação útil para o estudo da resposta inflamatória crônica na hanseníase.

## **2. JUSTIFICATIVA**

Esse estudo pretende estabelecer uma ferramenta de comparação entre granulomas imunogênicos e não imunogênicos, em modelo de coxim plantar de camundongos, visando contribuir com o entendimento de parâmetros celulares e moleculares na hanseníase experimental.

### 3. OBJETIVOS

- Propor um novo modelo de estudo para a hanseníase experimental.
  
- Investigar a formação de granulomas não infecciosos induzidos por partículas de nitrocelulose, em camundongos *nude* e BALB/c.
  
- Comparar lesões granulomatosas induzidas por nitrocelulose com o modelo de Shepard de infecção por *M. leprae*, por meio de análise histopatológica.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Modelo Biológico

Os ensaios foram conduzidos em 28 camundongos selvagens da linhagem BALB/c e 28 camundongos *nude* (N= 56), com 60 dias de vida, provenientes do Biotério do Instituto Lauro de Souza Lima/SES, Bauru/SP. O manuseio dos animais se deu conforme as normas da Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Lauro de Souza Lima, a partir de Princípios Éticos na Experimentação Animal, elaborados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL).

### 4.2 Desenho Experimental

Os animais foram divididos e inoculados nas duas patas, conforme as respectivas linhagens e condições experimentais, nos seguintes grupos: (G1) ML, *M. leprae* suspenso em Hanks' *Balanced Salt Solution* (HBSS); (G2) ML/NT, *M. leprae* em HBSS com nitrocelulose; (G3) NT, nitrocelulose em HBSS; (G4) CTRL, inoculação com veículo HBSS. Em todos os grupos foi adicionada associação de antibióticos, penicilina/estreptomicina a 1%. Aos 7-14-21-28 dias pós-inoculação (dpi), os animais foram eutanasiados por sobredose de cetamina 200 mg/kg (Syntec) e xilazina 30 mg/kg (Syntec), via intraperitoneal. Em seguida, as patas foram submetidas a antissepsia com etanol 70%, coletas e processadas para análise morfológica e baciloscópica.

### 4.3 Obtenção de Inóculo

A cepa Thai-53 de *M. leprae* foi propagada a partir de passagens seriadas em coxins plantares de camundongos *nude*, no Biotério Central do Instituto Lauro de Souza Lima (ILSL), de acordo com protocolos previamente estabelecidos<sup>30-21</sup>. Resumidamente, os animais foram inoculados nas patas traseiras com 30 µl de 10<sup>7</sup> bacilos/mL. Após 4-5 meses, com um aumento volumétrico considerável nas patas, os animais foram sacrificados. A suspensão bacilar foi preparada após dissecação, isolamento e digestão dos tecidos, separação, quantificação e

identificação bacilar, além do controle de microrganismos contaminantes e avaliação da viabilidade de *M. leprae*.

#### **4.4 Preparo da Suspensão de Nitrocelulose**

A obtenção de suspensão contendo partículas de nitrocelulose, pequenas o suficiente para serem devidamente fagocitadas, seguiu protocolos pré-estabelecidos<sup>28</sup>. Em resumo, uma tira de nitrocelulose com 20 mm<sup>2</sup> foi recortada em fragmentos menores, adicionados em 250µL de DMSO, por 60 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, um volume igual de tampão de carbonato/bicarbonato (0,05 M, pH 9,6) foi adicionado à solução de nitrocelulose em DMSO, gota a gota, em agitação por Vortex, a fim de se obter a precipitação de partículas minúsculas de nitrocelulose. Após a precipitação, a suspensão foi transferida e centrifugada a 10.000 *g*, por 10 minutos. As partículas de nitrocelulose foram ressuspensas em 1 mL de HBSS e divididas em alíquotas para os ensaios *in vivo* descritos nesse estudo.

#### **4.5 Infecção e Indução de Granuloma**

A infecção por *M. leprae* no grupo ML foi realizada por injeção intradérmica com 30 µL de suspensão bacilar na concentração de 1x10<sup>6</sup> BAAR/mL de HBSS nos dois coxins plantares de ambas as espécies de camundongos. No grupo ML/NT, o inóculo de *M. leprae* foi preparado em HBSS contendo nitrocelulose, conforme preparo descrito acima. No grupo NT, foram inoculados apenas 30 µL de nitrocelulose diluída em HBSS. O grupo CTRL foi constituído pelo veículo utilizado nos demais grupos, no mesmo volume e via de inoculação. Como citado anteriormente, os animais foram mantidos pelos tempos experimentais de 7-14-21-28 dpi.

#### **4.6 Técnica Histoquímica**

Parte dos espécimes foi submetida à coloração de rotina por Hematoxilina-Eosina (HE), para análise morfológica. Outra parte, foi destinada à avaliação baciloscóptica por coloração de Fite-Faraco (FF), ambas em microscopia óptica comum. Assim como HE, a coloração FF foi realizada conforme protocolos pré-estabelecidos no Laboratório de Anatomia Patológica do ILSL. Na coloração FF, os cortes foram recobertos por óleo mineral durante 30 minutos, a 60

°C. Em seguida, o excesso de óleo foi removido em água corrente e os cortes secos em temperatura ambiente. Posteriormente, foi adicionada fucsina filtrada e mantida por 30 minutos. Ao término do período, os espécimes foram lavados em água corrente e passados rapidamente em ácido acético glacial (diferenciador). Os espécimes foram novamente lavados com água corrente e corados com azul de metileno. O excesso de corante foi removido em água corrente e os cortes foram desidratados etanol e diafanizados em xilol, para montagem em meio hidrofóbico Permount™ (Fisher Chemical).

#### **4.7 Avaliação Histopatológica e Baciloscopia**

Os critérios microscópicos avaliados incluíram, a localização do infiltrado inflamatório: anexos, músculos, nervos e vasos, assim como o tipo de infiltrado: mononuclear (MN), polimorfonuclear (PMN), macrófagos vacuolizados (MØ vac.), macrófagos epitelioides (MØ epi.), CGMN. Os achados receberam escores semiquantitativos: ausente (0), raro (1), presente (2) e frequente (3). Em seguida, foi estimada a frequência relativa (%) de cada escore em relação à cada critério microscópico, em todos os grupos e tempos experimentais. A determinação do índice baciloscópico foi realizada conforme a Escala de Ridley: 0 = ausente; 1 = 1-10 bacilos em 100 campos; 2 = 1-10 bacilos em 10 campos; 3 = 1-10 bacilos por campo; 4 = 10-100 bacilos por campo; 5 = 100-1000 bacilos por campo; 6 = mais 1000 bacilos por campo<sup>31</sup>.

#### **4.8 Análise Estatística**

A análise dos resultados foi executada no software GraphPad Prism 7.04® (GraphPad Inc. USA). Escores semiquantitativos foram categorizados quanto às respectivas frequências relativas, em termos percentuais, em cada condição experimental. Dados específicos foram por análise de variância de duas vias com medidas repetidas (*Two-way repeated measures ANOVA*). Valores de  $p < 0,05$  foram estabelecidos como indicadores de significância.

## RESULTADOS

A análise histopatológica foi realizada em todos os grupos e tempos experimentais, por uma patologista, duas vezes subsequentes. Inicialmente, foram determinadas características microscópicas gerais de cada espécime e em seguida, foi realizada categorização de critérios relativos à localização e tipo de infiltrado inflamatório, conforme detalhado na metodologia.

Aos achados microscópicos foram atribuídos escores semiquantitativos, posteriormente submetidos a testes estatísticos. A frequência desses achados foi também apresentada em termos percentuais. Os dois fenótipos murinos avaliados de 07 a 28 dias não demonstraram diferenças histopatológicas importantes. Desse modo, ambas (*nude* e BALB/c) foram analisadas em conjunto. Na avaliação baciloscópica pela coloração FF, não foram observados bacilos álcool-ácido resistentes.

A suspensão de nitrocelulose gerou granulomas em todos os grupos onde foi utilizada, predominando infiltrado inflamatório mononuclear, principalmente entre fibras musculares esqueléticas. As células inflamatórias também foram identificadas ao redor dos nervos plantares e pequenos vasos sanguíneos. Foi observado discreto exsudato serofibrinoso em alguns espécimes.

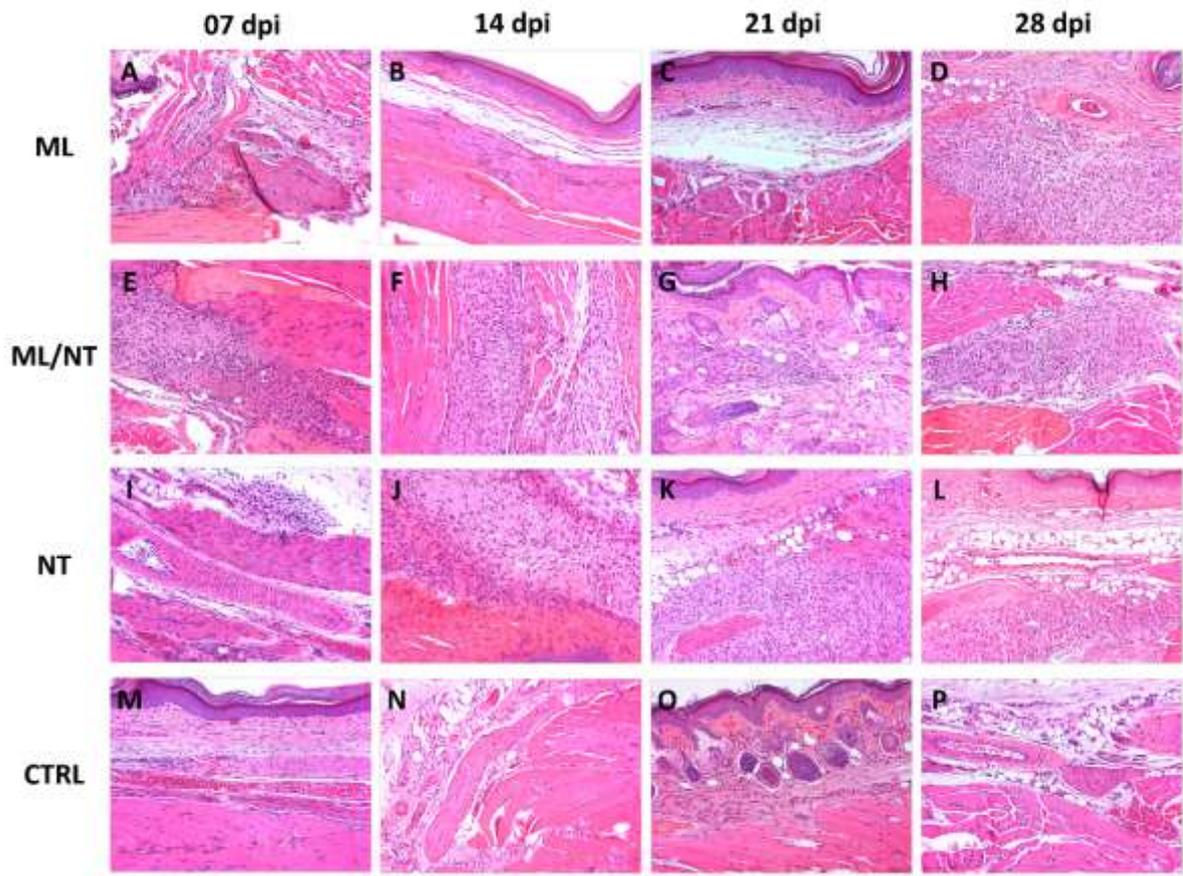
As células mononucleares que ocorreram com maior frequência foram MØ epitelioides, seguidos de MØ vacuolizados em menor concentração. Não foram observadas CGMN em quaisquer grupos ou tempos experimentais. Algumas lesões induzidas por nitrocelulose pareceram conter partículas fagocitadas, conferindo por vezes aspecto finamente granular aos MØ.

Na avaliação semiquantitativa, a intensidade do infiltrado se alterou significativamente, quando os dados foram comparados coletivamente nos diferentes tempos experimentais ( $p = 0,0008$ ) e grupos ( $p < 0,0001$ ). A presença moderada do infiltrado mononuclear no grupo ML (G1) foi mais observada aos 07 dpi e diminuiu ao longo do período, permanecendo ausente em alguns espécimes em 28 dpi. No segundo grupo infectado e com adição de nitrocelulose, ML/NT (G2), o infiltrado mononuclear se manteve moderado em todo

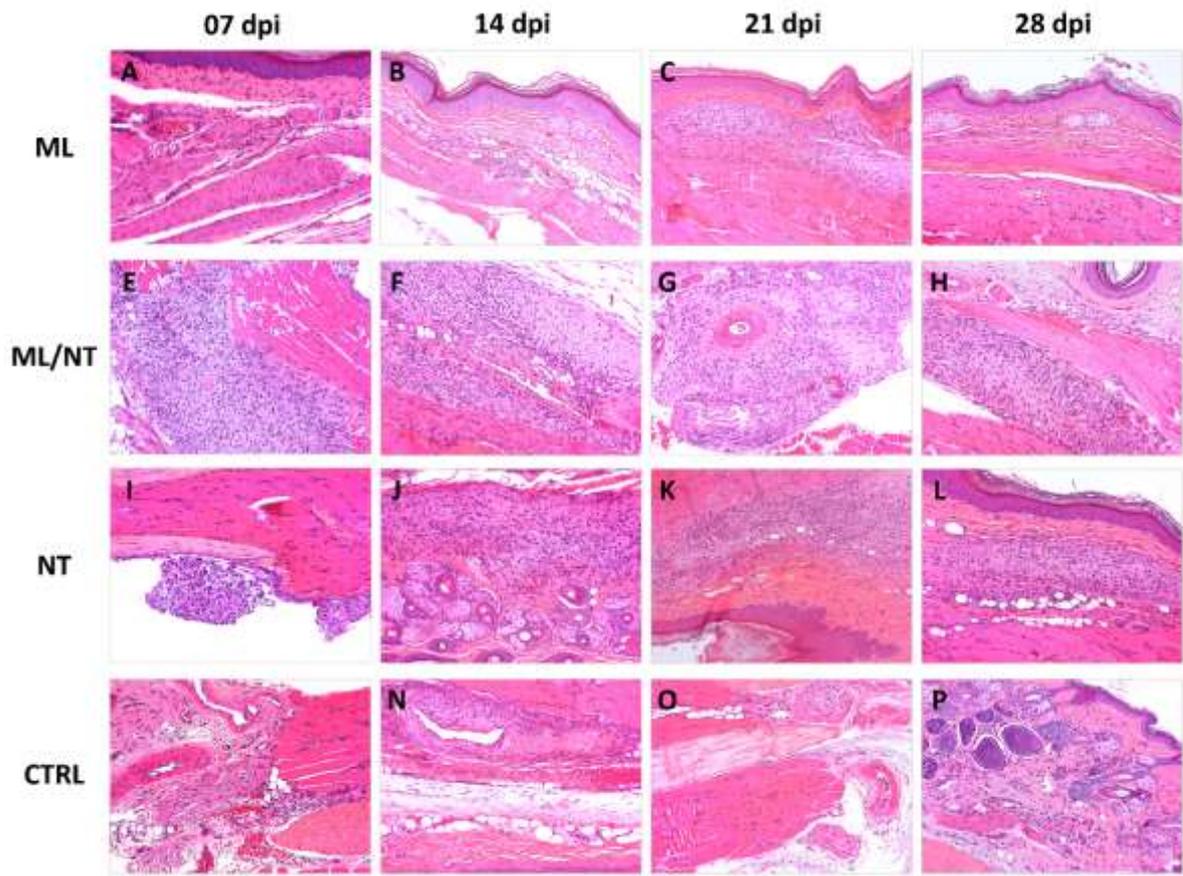
o período. O terceiro grupo experimental, NT (G3), no qual somente a suspensão de nitrocelulose foi inoculada nos coxins plantares, observaram-se raras células mononucleares aos 07 dpi, com intensificação de sua presença em 14-21-28 dpi. Raras células mononucleares foram identificadas no grupo CTRL (G4).

O infiltrado inflamatório polimorfonuclear foi raro ou ausente nas diferentes condições experimentais. O grupo infectado ML (G1) demonstrou polimorfonucleares de modo inconspícuo, apenas em 21 dpi. Nos grupos ML/NT (G2) e NT (G3), esse tipo de infiltrado foi observado nos tempos 07-14-21 dpi, também com presença discreta. O grupo CTRL (G4) não apresentou infiltrado polimorfonuclear. Assim como na avaliação do infiltrado mononuclear, a presença de células polimorfonucleares diferiu estatisticamente quando comparados os tempos ( $p = 0,0073$ ) e grupos ( $p < 0,0001$ ).

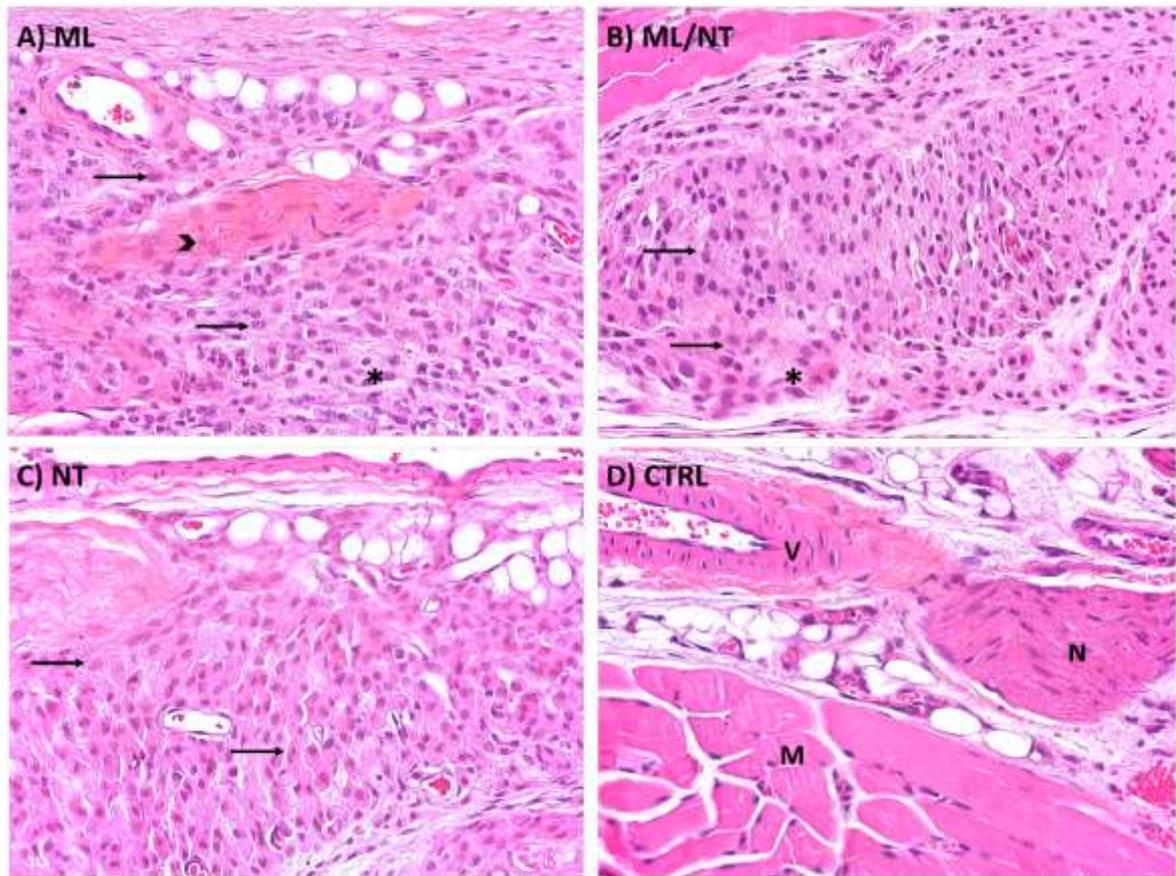
A classificação por escores quanto ao tipo morfológico de MØ, indicou que células de citoplasma vacuolizado estiveram presentes no grupo ML (G1) somente em 21 dpi, enquanto que no grupo ML/NT (G2) foram observadas em todos os tempos experimentais, com destaque para 21 dpi. No grupo NT (G3), também foram observados raros MØ vacuolizados entre 07 e 21 dpi. O grupo CTRL (G4) não apresentou esse tipo celular. Não houveram diferenças estatisticamente significantes entre os tempos experimentais ( $p = 0,0834$ ), porém tais diferenças foram encontradas na comparação entre os grupos com diferentes estímulos ( $p < 0,0001$ ). Do mesmo modo, a avaliação de MØ epitelioides não retornou diferenças estatisticamente significantes quanto aos tempos experimentais ( $p = 0,2035$ ), mas sim quando grupos foram comparados entre si ( $p < 0,0001$ ).



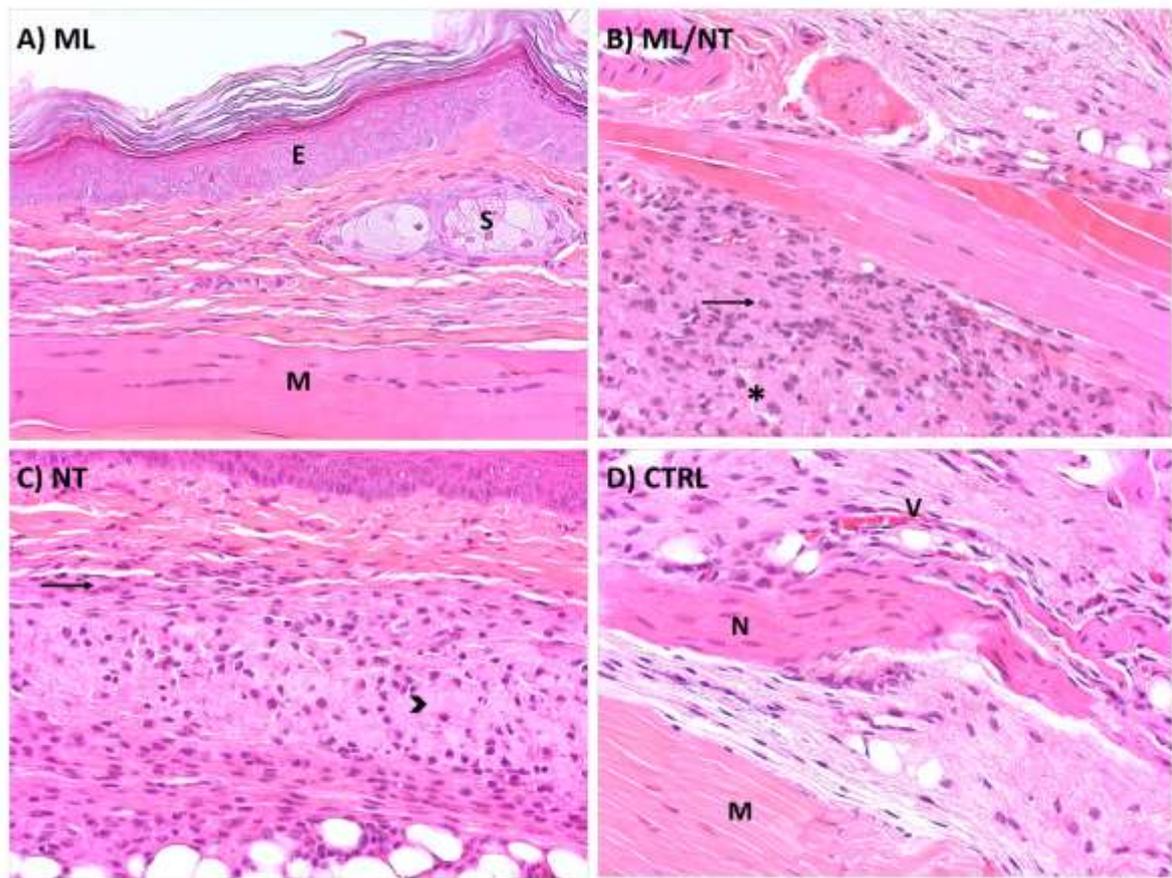
**Figura 1. Granuloma experimental em camundongos *nude*.** Fotomicrografia de coxins plantares com lesões induzidas por *M. leprae* (ML) (A-D), *M. leprae* em suspensão de nitrocelulose (ML/NT) (E-H), nitrocelulose (NT) (I-L) e veículo controle (CTRL) (M-P), após 07-14-21-28 dias pós-inoculação (dpi). Os grupos ML, ML/NT e NT (A-L) demonstraram infiltrado inflamatório mononuclear ao longo da derme reticular, entre as fibras musculares e tecido subcutâneo. Nos grupos CTRL (M-P), observou-se discreto infiltrado permeando áreas da derme papilar e reticular. Aumento: 200X



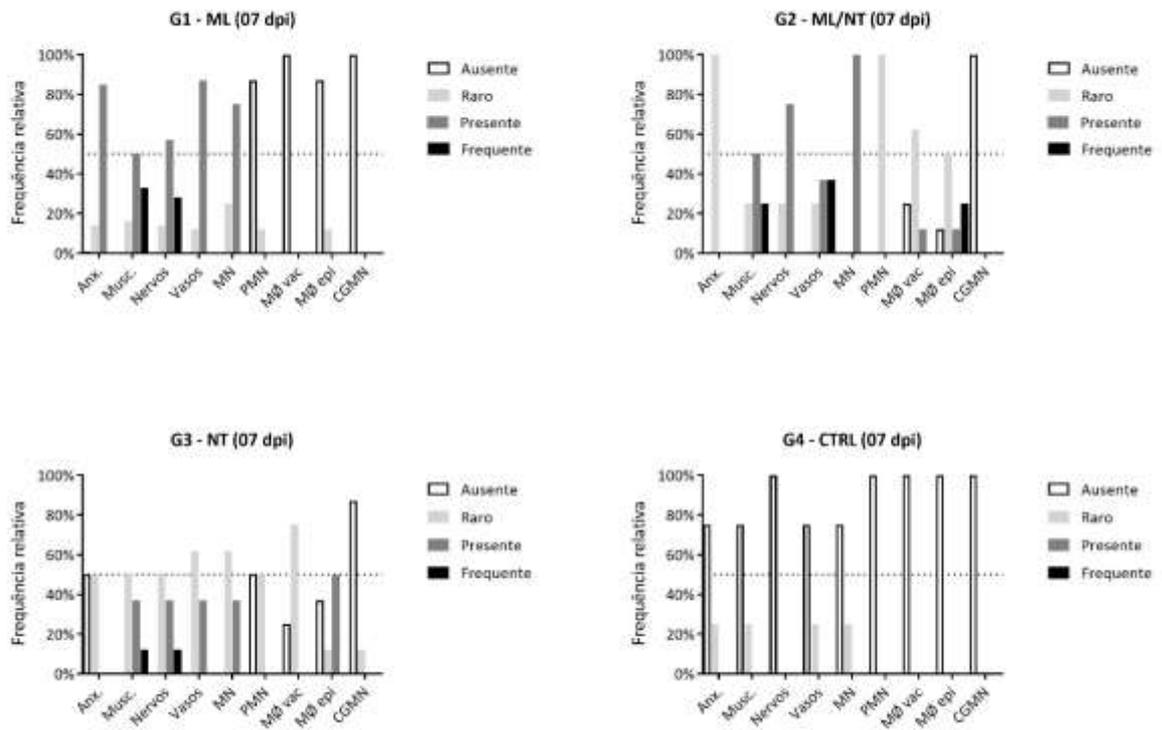
**Figura 2. Granuloma experimental em camundongos BALB/c.** Os aspectos microscópicos se assemelharam aos observados nos camundongos *nude* em lesões induzidas por *M. leprae* (ML) (A-D), *M. leprae* em suspensão de nitrocelulose (ML/NT) (E-H), nitrocelulose (NT) (I-L) e veículo controle (CTRL) (M-P), em 07-14-21-28 dias pós-inoculação (dpi). Os grupos ML, ML/NT e NT (A-L) apresentaram infiltrado inflamatório mononuclear ao longo da derme reticular, entre as fibras musculares e tecido subcutâneo. Nos controles (M-P), observou-se discreto infiltrado permeando áreas da derme papilar e reticular. Aumento: 200X



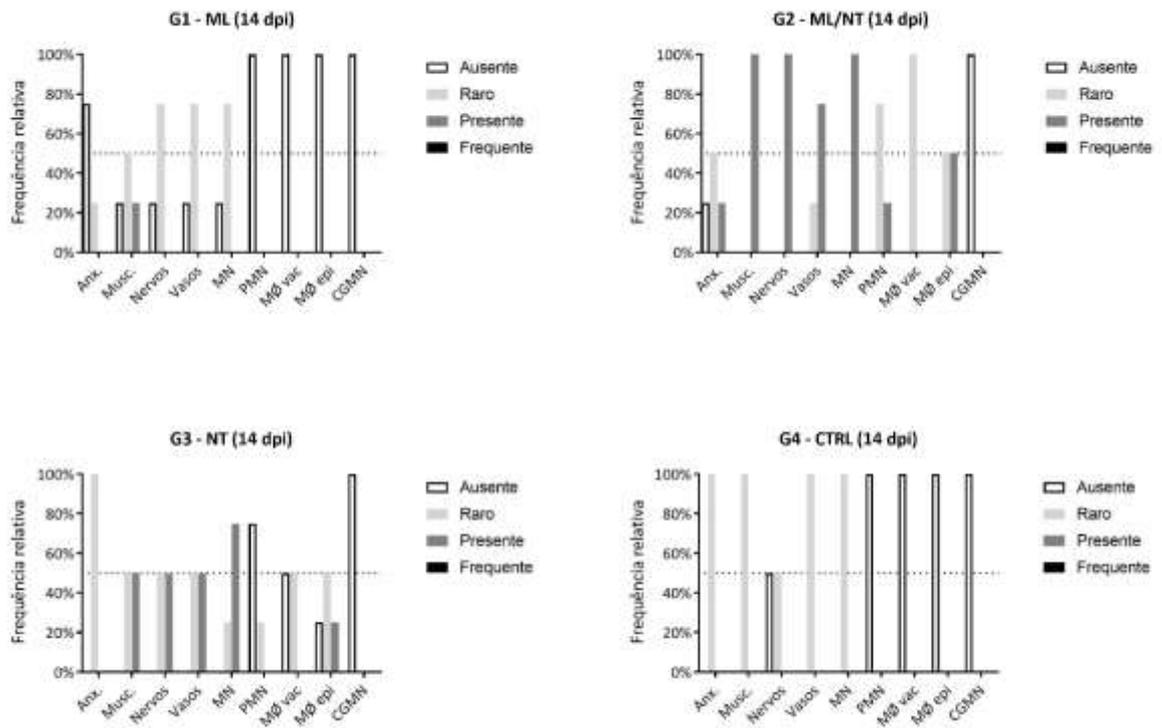
**Figura 3. Granuloma experimental em camundongos *nude*, 28 dias pós-inoculação (dpi).** Detalhe em maior aumento de lesões induzidas por *M. leprae* (ML), *M. leprae* em suspensão de nitrocelulose (ML/NT), nitrocelulose (NT) e veículo controle (CTRL) (A-D). Todos os grupos experimentais demonstram acúmulos de macrófagos com morfologia epitelióide (setas) (A, B, C) com raras células de citoplasma vacuolizado (asteriscos) nos grupos ML e ML/NT (A, B). No grupo ML (A), nota-se ainda, ramo nervoso parcialmente delaminado (cabeça de seta). No grupo CTRL (D), observam-se vasos sanguíneos (V), ramos nervosos (N) e fibras musculares (M) dentro dos padrões de normalidade. Aumento: 400X



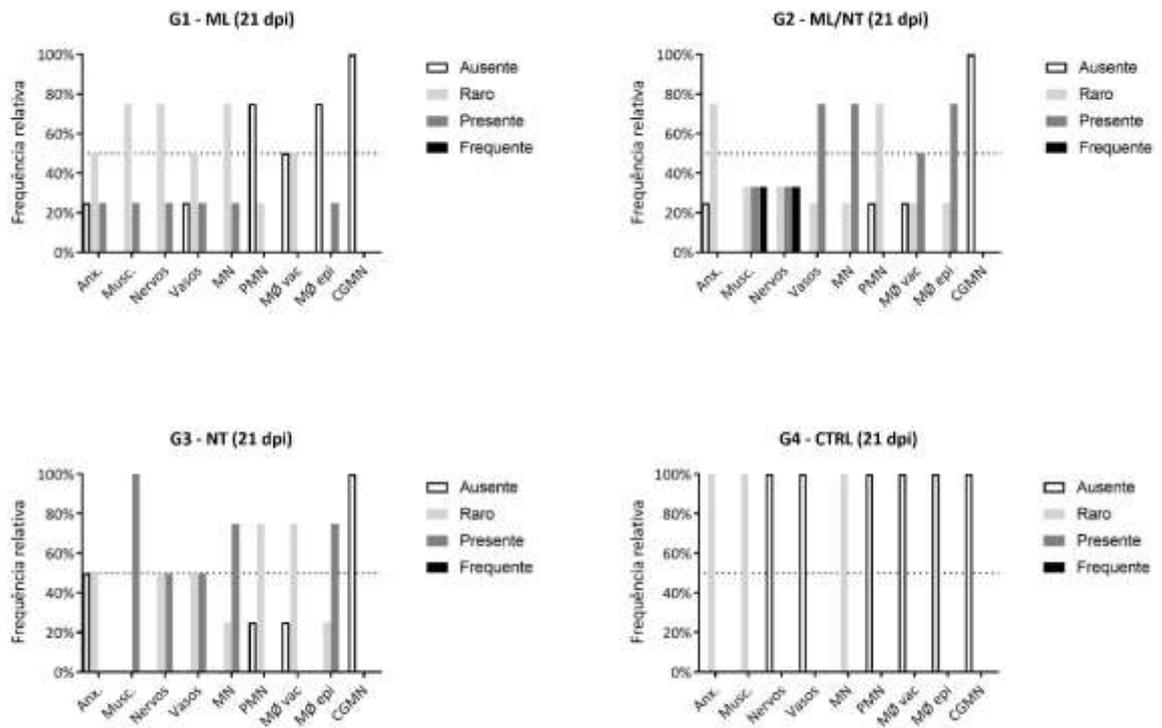
**Figura 4. Granuloma experimental em camundongos BALB/c, 28 dias pós-inoculação (dpi).** Detalhe em maior aumento de lesões induzidas por *M. leprae* (ML), *M. leprae* em suspensão de nitrocelulose (ML/NT), nitrocelulose (NT) e veículo controle (CTRL) (A-D). Em (A), o grupo ML apresenta corte microscópico superficial onde se nota epitélio pavimentoso estratificado (E), ácinos de glândula sebácea (S) e fibras musculares esqueléticas (M). O grupo ML/NT (B) demonstra acúmulos de macrófagos com morfologia epitelióide (setas) com raras células de citoplasma vacuolizado (asterisco). No grupo NT (C), além do aspecto epitelióide (seta), alguns macrófagos demonstram citoplasma hialino e finamente granular (cabeça de seta). No grupo CTRL (D), observam-se vasos sanguíneos (V), ramos nervosos (N) e fibras musculares (M) dentro dos padrões de normalidade Aumento: 400X



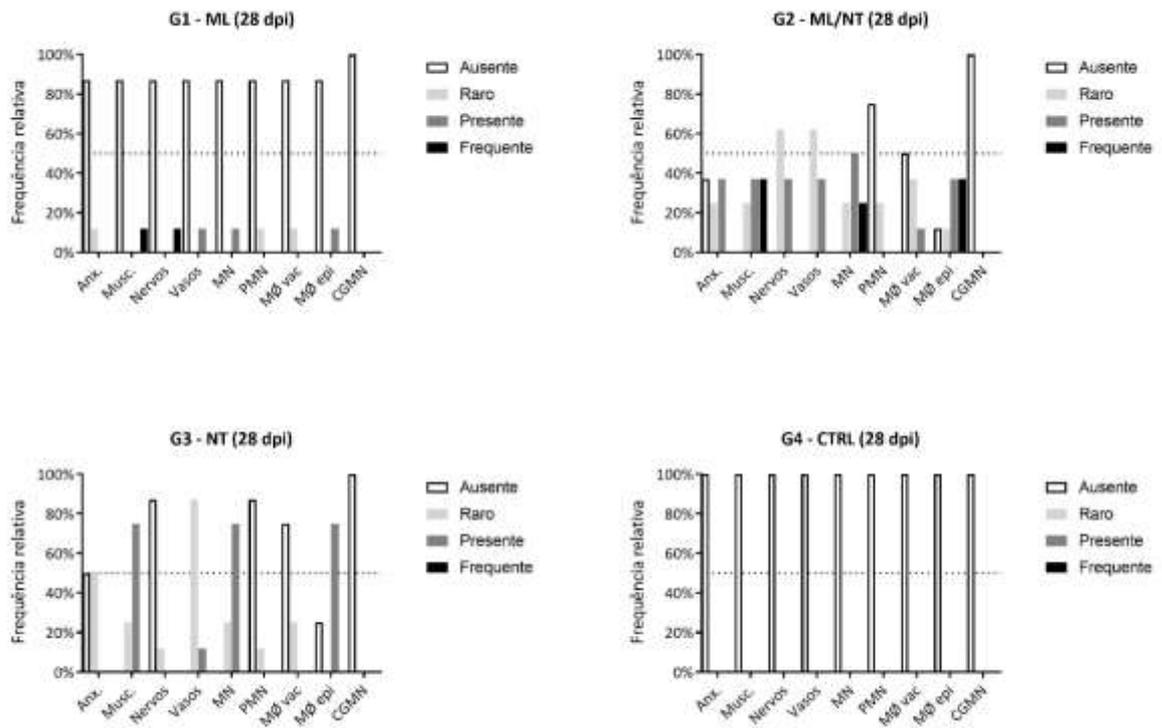
**Figura 5. Infiltrado inflamatório após 07 dias de inoculação.** Gráficos indicam a frequência relativa (%) de aspectos microscópicos observados nos coxins plantares de camundongos *nude* e BALB/c, quanto à localização e tipo de infiltrado, nos grupos experimentais (ML, ML/NT, NT) e controle (CTRL). Anx. = anexos cutâneos; Musc. = musculatura esquelética estriada; Nervos = ramos nervosos plantares; Vasos = vasos sanguíneos; MN = mononucleares; PMN = polimorfonucleares; MØ vac. = macrófagos vacuolizados; MØ epi. = macrófagos epitelioides; CGMN = células gigantes multinucleadas



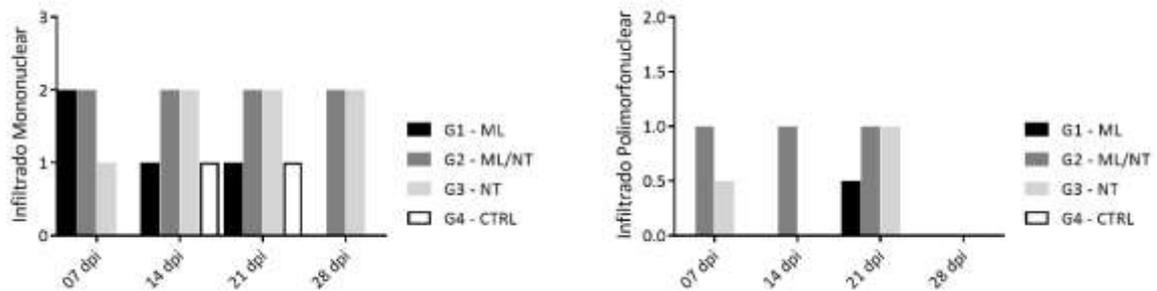
**Figura 6. Infiltrado inflamatório após 14 dias de inoculação.** Frequência relativa (%) de aspectos microscópicos observados nos coxins plantares de camundongos *nude* e BALB/c, quanto à localização e tipo de infiltrado, nos grupos experimentais (ML, ML/NT, NT) e controle (CTRL). Anx. = anexos cutâneos; Musc. = musculatura esquelética estriada; Nervos = ramos nervosos plantares; Vasos = vasos sanguíneos; MN = mononucleares; PMN = polimorfonucleares; MØ vac. = macrófagos vacuolizados; MØ epi. = macrófagos epitelioides; CGMN = células gigantes multinucleadas



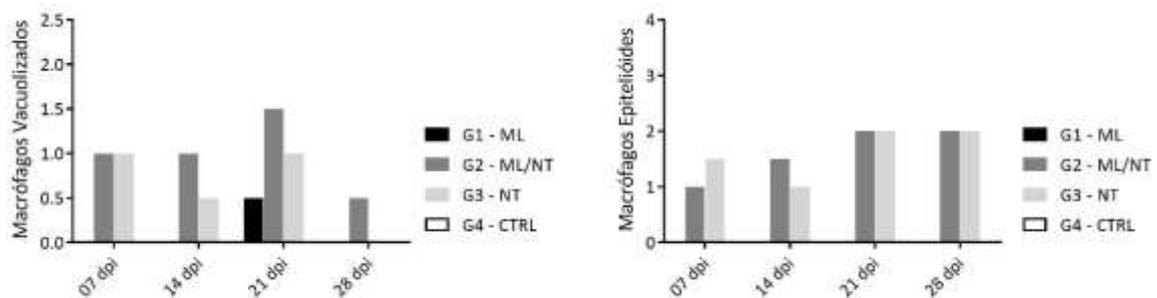
**Figura 7. Infiltrado inflamatório após 21 dias de inoculação.** Frequência relativa (%) de aspectos microscópicos observados nos coxins plantares de camundongos *nude* e BALB/c, quanto à localização e tipo de infiltrado, nos grupos experimentais (ML, ML/NT, NT) e controle (CTRL). Anx. = anexos cutâneos; Musc. = musculatura esquelética estriada; Nervos = ramos nervosos plantares; Vasos = vasos sanguíneos; MN = mononucleares; PMN = polimorfonucleares; MØ vac. = macrófagos vacuolizados; MØ epi. = macrófagos epitelioides; CGMN = células gigantes multinucleadas



**Figura 8. Infiltrado inflamatório após 28 dias de inoculação.** Frequência relativa (%) de aspectos microscópicos observados nos coxins plantares de camundongos *nude* e BALB/c, quanto à localização e tipo de infiltrado, nos grupos experimentais (ML, ML/NT, NT) e controle (CTRL). Anx. = anexos cutâneos; Musc. = musculatura esquelética estriada; Nervos = ramos nervosos plantares; Vasos = vasos sanguíneos; MN = mononucleares; PMN = polimorfonucleares; MØ vac. = macrófagos vacuolizados; MØ epi. = macrófagos epitelioides; CGMN = células gigantes multinucleadas



**Figura 9. Tipo de infiltrado inflamatório em granulomas induzidos por *M. leprae* e/ou nitrocelulose.** Comparação entre tempos experimentais (07-14-21-28 dpi) e grupos (ML, ML/NT, NT, CTRL), pelo teste estatístico *Two-way* ANOVA, quanto à presença de infiltrado mononuclear (tempos:  $p = 0,0008$ ) (grupos:  $p < 0,0001$ ) e polimorfonuclear (tempos:  $p = 0,0073$ ) (grupos:  $p < 0,0001$ )



**Figura 10. Morfologia dos macrófagos nos granulomas induzidos por *M. leprae* e/ou nitrocelulose.** Comparação entre tempos (07-14-21-28 dpi) e grupos (ML, ML/NT, NT, CTRL), pelo teste estatístico *Two-way* ANOVA, quanto à presença de macrófagos vacuolizados (tempos:  $p = 0,0834$ ) (grupos:  $p < 0,0001$ ) e epitelióides (tempos:  $p = 0,2035$ ) (grupos:  $p < 0,0001$ )

## DISCUSSÃO

Preparações de nitrocelulose estão entre as formas de desenvolvimento de granulomas não imunogênicos em experimentação animal<sup>28-29</sup>. O presente estudo confrontou a indução de granulomas por partículas de nitrocelulose com lesões induzidas por *M. leprae* em coxins plantares de camundongos adultos, a fim de se estabelecer um modelo murino de resposta inflamatória crônica, não infecciosa, comparável ao modelo estabelecido por Shepard<sup>15</sup>.

Foram testados dois fenótipos de camundongos, *nude* e BALB/c selvagem. Os animais foram divididos em grupos e inoculados com suspensão de *M. leprae* (ML), suspensão de nitrocelulose (NT), associação de *M. leprae* com nitrocelulose (ML/NT) e veículo controle (CTRL). Após 07, 14, 21 e 28 dias, amostras foram coletadas e analisadas histopatologicamente pela coloração de Hematoxilina-Eosina. A presença de *M. leprae* nos grupos infectados foi avaliada pela coloração Fite-Faraco, a partir da qual se estima o índice baciloscópico pela escala de Ridley<sup>31</sup>. Inicialmente, os achados microscópicos foram submetidos à categorização quanto à localização e tipo de infiltrado inflamatório presente em cada espécime. Em seguida, foram estabelecidos escores semiquantitativos e os mesmos submetidos a testes estatísticos. A frequência relativa desses escores foi também apresentada em termos percentuais.

O fenótipo *nude* foi descrito inicialmente por Flanagan (1966)<sup>32</sup>, que relatou uma linhagem de camundongos com mutação espontânea no gene *Foxn1*, gerando animais sem pelos (*nude*) e com maior taxa de mortalidade<sup>32</sup>. Posteriormente, Pantelouris (1968)<sup>33</sup> constatou que esses animais *nude* eram atímicos, com deficiência de linfócitos T<sup>33</sup>. Apesar dessa característica crucial, no desenho experimental adotado em nosso estudo, não pudemos observar diferenças histopatológicas importantes entre os dois fenótipos (*nude* e BALB/c selvagem) ao longo do período pós-inoculação. Acreditamos que as diferenças relativamente discretas quanto ao infiltrado inflamatório desses animais, provavelmente aumentariam se o período de experimentação fosse mais prolongado.

Na avaliação baciloscóptica pela coloração FF, não foram observados bacilos álcool-ácido resistentes. Essa ausência de *M. leprae* no sítio de inoculação era relativamente previsível, visto que já foi descrita anteriormente em experimentação animal, a localização insuficiente desse patógeno nos tecidos em até aproximadamente doze semanas <sup>34</sup>. A razão ainda não foi determinada com precisão, mas acredita-se que os bacilos são inicialmente drenados pelos vasos linfáticos até os linfonodos regionais, onde se orchestra a resposta imune adaptativa. A incapacidade do organismo hospedeiro eliminar eficientemente *M. leprae* permitiria, em um segundo momento, que o bacilo se multiplique e retorne aos tecidos-alvo, formando granulomas ao longo do trajeto dos ramos nervosos cutâneos <sup>35</sup>.

Assim como *M. leprae*, a suspensão de nitrocelulose gerou granulomas em todos os grupos onde foi utilizada, embora tenha se notado que as lesões induzidas exclusivamente pelo bacilo pareceram menos exuberantes do que às aquelas observadas nos demais grupos experimentais. Granulomas podem ser definidos como tipos especiais de reação inflamatória crônica, nos quais os MØ sofrem modificações estruturais e funcionais a fim de aumentar sua eficiência fagocítica. Apesar dos principais componentes de um granuloma serem MØ epitelioides, eventualmente são observadas CGMN, resultantes da fusão de vários MØ que se modificam a fim de promover a contenção do agente agressor <sup>9</sup>. Em nosso estudo, não foram observadas CGMN, provavelmente devido a fatores como o tipo de agente agressor, a forma de preparação de cada inóculo e o tempo de incubação relativamente curto.

Nos cortes microscópicos que apresentaram resposta inflamatória granulomatosa predominou, de fato, infiltrado inflamatório mononuclear, principalmente entre as fibras musculares esqueléticas. Presume-se que a maior presença do infiltrado entre essas fibras possa corresponder ao ponto de inoculação em cada espécime. Inoculação essa que é descrita inicialmente como intradérmica, considerando a Técnica de Shepard <sup>15</sup>, mas devido às dimensões diminutas dos tecidos, talvez seja concebível que a suspensão extrapole por entre a musculatura dos coxins plantares murinos.

Nos grupos estimulados por nitrocelulose e/ou infectados por *M. leprae*, MØ epitelioides foram observados com maior frequência, seguidos por MØ vacuolizados em menor concentração. A avaliação de MØ epitelioides não retornou diferenças

estatisticamente significantes quanto aos tempos experimentais distintos ( $p = 0,2035$ ), mas tais diferenças foram constatadas quando os grupos foram comparados entre si ( $p < 0,0001$ ). *MØ* vacuolizados não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre tempos experimentais ( $p = 0,0834$ ), porém as mesmas foram observadas na comparação entre os grupos com diferentes estímulos ( $p < 0,0001$ ). Adicionalmente, algumas lesões induzidas por nitrocelulose pareceram, ainda, conter partículas fagocitadas, conferindo aspecto finamente granular a tais células.

A intensidade do infiltrado inflamatório variou significativamente, quando os diferentes tempos ( $p = 0,0008$ ) e grupos experimentais ( $p < 0,0001$ ) foram comparados coletivamente. No grupo exclusivamente infectado por *M. leprae*, o infiltrado inflamatório se destacou inicialmente, aos 07 dpi, e diminuiu ao longo do período. Por outro lado, o grupo inoculado somente com suspensão de nitrocelulose foram observadas raras células mononucleares aos 07 dpi, aumentando nos tempos mais tardios. Assim como no infiltrado mononuclear, a presença muito discreta de células polimorfonucleares diferiu estatisticamente quando comparados os tempos ( $p = 0,0073$ ) e grupos ( $p < 0,0001$ ).

## **CONCLUSÃO**

Sob as condições experimentais aqui ensaiadas, é possível inferir que a nitrocelulose em suspensão intensifica a resposta macrofágica, quando inoculada em coxins plantares de camundongos *nude* e selvagens da linhagem BALB/c. Sugere-se ainda, que esse composto pode ser utilizado não só para o desenvolvimento de granulomas não imunogênicos, mas também na exacerbação da resposta imune em granulomas induzidos por agentes infecciosos, como *M. leprae*.

## **CONFLITO DE INTERESSES**

Nenhum declarado.

## REFERÊNCIAS

1. Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1966 Jul-Sep; 34(3):255-73.
2. Casalenovo, M. B. Avaliação de Marcadores de Diferenciação em Células de Schwann Murinas submetidas à Infecção por *Mycobacterium leprae*. Dissertação de Mestrado. Botucatu, 2017.
3. Kumar B, Uprety S, Dogra S. 9 February 2017, posting date. Clinical diagnosis of leprosy, Chapter 2.1. In Scollard DM, Gillis TP (ed), International textbook of leprosy. [www.internationaltextbookofleprosy.org](http://www.internationaltextbookofleprosy.org).
4. WHO. Global leprosy update, 2018: moving towards a leprosy free world. *Wkly Epidemiol Rec*, v. 94, n. 35/36, p. 389-412, 2019.
5. Reibel F, Cambau E, Aubry A. Update on the epidemiology, diagnosis, and treatment of leprosy. *Med Mal Infect.* 2015 Sep; 45(9):383-93.
6. van der Wel N, Hava D, Houben D, Fluitsma D, van Zon M, Pierson J, Brenner M, Peters PJ. *M. tuberculosis* and *M. leprae* translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cells. *Cell.* 2007 Jun 29; 129(7):1287-98.
7. Ooi WW, Srinivasan J. Leprosy and the peripheral nervous system: basic and clinical aspects. *Muscle Nerve.* 2004; Oct;30(4):393-409.
8. Md, Damjanov Ivan. *Pathology Secrets*. 3rd ed., Mosby, 2008.
9. Site: <http://anatpat.unicamp.br/laminfl8.html#GRANULOMAS>.

10. Birdi TJ, Antia NH. Mechanisms involved in peripheral nerve damage in leprosy with special reference to insights obtained from in vitro studies and the experimental mouse model. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 2003 Dec;71(4):345-54.
11. Scollard DM, Truman RW, Ebenezer GJ. Mechanisms of nerve injury in leprosy. *Clin Dermatol.* 2015 Jan-Feb; 33(1):46-54.
12. Lenz S, Collins JH, Lahiri R, Adams LB. 14 June 2020, posting date. Rodent models in leprosy research. In Scollard DM, Gillis TP (ed), *International textbook of leprosy.*
13. Sharma R, Lahiri R, Scollard DM, Pena M, Williams DL, Adams LB, Figarola J, Truman RW. The armadillo: a model for the neuropathy of leprosy and potentially other neurodegenerative diseases. *Disease Models & Mechanisms* 2013 6: 19-24.
14. Truman RW, Ebenezer GJ, Pena MT, Sharma R, Balamayooran G, Gillingwater TH, Scollard DM, McArthur JC, Rambukkana A. The armadillo as a model for peripheral neuropathy in leprosy. *ILAR J.* 2014;54(3):304-14.
15. Shepard CC. The experimental disease that follows the injection of human leprosy bacilli into foot pads of mice. *J Exp Med.* 1960; 112: 445-454.
16. Vilani-Moreno FR, Barbosa ASAA, Sartori BGC, Diório SM, Silva SMUR, Rosa PS, de Faria Fernandes Belone A, Soares CT, Lauris JRP, Pedrini SCB. Murine experimental leprosy: Evaluation of immune response by analysis of peritoneal lavage cells and footpad histopathology. *Int J Exp Pathol.* 2019 Jun;100(3):161-174.
17. Arumugam S, Joseph P, Ponnaiya J, Richard J, Das M, Chaitanya VS, Ebenezer M. Evaluation of New Antibacterial Drugs and their Combinations in a Murine Model to Identify Short Duration Alternative Chemotherapy for Leprosy. *Indian J Lepr.* 2016 Jul-Sep;88(3):159-76.

18. Hagge DA, Scollard DM, Ray NA, Marks VT, Deming AT, Spencer JS, Adams LB IL-10 and NOS2 modulate antigen-specific reactivity and nerve infiltration by T cells in experimental leprosy. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014 Sep 11;8(9): e3149.
19. Colston MJ, Hilson GRF. Growth of *Mycobacterium leprae* and *M. marinum* in congenitally athymic (nude) mice. *Nature*. 1976; 262: 399-401.
20. Adams LB, Pena MT, Sharma R, Hagge DA Schurr E, Truman RW. Insights from animal models on the immunogenetics of leprosy: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012 Dec;107 Suppl 1:197-208.
21. Lahiri R, Randhawa B, Franken KL, Duthie MS, Spencer JS, Geluk A, Krahenbuhl JL. Development of a mouse food pad model for detection of sub clinical leprosy. *Lepr Rev*. 2011 Dec;82(4):432-44.
22. Greenfield EA. Immunizing Mice and Rats with Nitrocellulose-Bound Antigen. *Cold Spring Harb Protoc*. 2019 Dec 2;2019(12).
23. Anderson ET, Davis AS, Law JM, Lewbart GA, Christian LS, Harms CA. Gross and histologic evaluation of 5 suture materials in the skin and subcutaneous tissue of the California sea hare (*Aplysia californica*). *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2010 Jan;49(1):64-8.
24. Kuznetsova IV, Maiborodin IV, Shevela AI, Barannik MI, Manaev AA, Brombin AI, Maiborodina VI. Local tissue reaction to implantation of biodegradable suture materials. *Bull Exp Biol Med*. 2014 Jul;157(3):390-4.
25. Eryilmaz R, Demir M, Aslan R. Rare complication of varicocelelectomy: Suture granuloma. *Andrologia*. 2019 Jun;51(5): e13256.
26. Sakai K, Nakano K, Matsuda S, Tsujigiwa H, Ochiai T, Shoumura M, Osuga N, Hasegawa H, Kawakami T. Pathological Analysis of Cell Differentiation in Cholesterol Granulomas Experimentally Induced in Mice. *Int J Med Sci*. 2016 Feb 19;13(3):220-4.

27. Hisamuddin N, Shaik Mossadeq WM, Sulaiman MR, Abas F, Leong SW, Kamarudin N, Ong HM, Ahmad Azmi AF, Ayumi RR, Talib M. Anti-Edematogenic and Anti-Granuloma Activity of a Synthetic Curcuminoid Analog, 5-(3,4-Dihydroxyphenyl)-3-hydroxy-1-(2-hydroxyphenyl) penta-2,4-dien-1-one, in Mouse Models of Inflammation. *Molecules*. 2019 Jul 18;24(14):2614.
28. Abou-Zeid C, Filley E, Steele J, Rook GA. A simple new method for using antigens separated by polyacrylamide gel electrophoresis to stimulate lymphocytes *in vitro* after converting bands cut from Western blots into antigen-bearing particles. *J Immunol Methods*. 1987;98(1):5-10.
29. Hernandez-Pando R, Bornstein QL, Aguilar Leon D, Orozco EH, Madrigal VK, Martinez Cordero E. Inflammatory cytokine production by immunological and foreign body multinucleated giant cells. *Immunology*. 2000; 100(3): 352-358.
30. Trombone AP, Pedrini SC, Diório SM, Belone Ade F, Fachin LR, do Nascimento DC, Rosa PS. Optimized protocols for *Mycobacterium leprae* strain management: frozen stock preservation and maintenance in athymic nude mice. *J Vis Exp*. 2014 Mar 23;(85):50620.
31. Ridley DS. A logarithmic index of bacilli in biopsies. *Int J Lepr*. 1967; 35:187.
32. Flanagan, SP. "Nude" a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. *Genet Res*. 8: 295–309. 1966.
33. Pantelouris, EM. Absence of thymus in a mouse mutant. *Nature*. 217: 370–371. 1968.
34. Evans MJ, Levy L. Ultrastructural changes in cells of the mouse footpad infected with *Mycobacterium leprae*. *Infect Immun*. 1972 Feb;5(2):238-47.
35. Levy L, Ji B. The mouse foot-pad technique for cultivation of *Mycobacterium leprae*. *Lepr Rev*. 2006 Mar;77(1):5-24.